

Nyúl kazein emésztése tripszinnel és antibakteriális hatású peptidek izolálása

Savas kicsapással (pH 4,6) nyúltejből kazein frakciót izoláltam, majd ezt emésztettem tripszinnel. Az első tisztítási lépésben az emésztéssel keletkezett peptideket fordított fázisú FPLC kromatográfiával, Nucleosil 120-10 C18 oszlopon (Macherey-Nagel, Oensingen, Svájc) izoláltam. A frakciókat a kromatogramnak megfelelően (1. ábra) pool-okba egyesítettem, és a pool-ok antibakteriális hatását három baktériumtörzzsel szemben teszteltem (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus lentus*) (1. táblázat).

Az antibakteriális hatást Pellegrini és mtsi (1997) által leírt módszer szerint vizsgáltam: a baktériumokat (kb. 10^5 cfu/ml 10 mM Na-foszfát pufferben, pH 7,4) a mintákhoz kevertem, és 2% TSB (trypticase soy broth) jelenlétében 2 óra hosszat inkubáltam 37°C-on. A baktérium szuszpenziót kihígítás után TSA (trypticase soy agar) lemezekre kentem ki és 14-18 óra 37°C-on történő inkubáció után megszámoltam a kinőtt telepek számát. Az antibakteriális aktivitást a $\log(N_0/N_1)$ képlet szerint számoltam ki, ahol N a kinőtt baktériumtelepek száma a vizsgált minta jelenlétében (N_1) ill. távollétében (N_0).

A tripszinnel emésztett kazein az első tisztítási lépésben 11 pool-t eredményezett (1. ábra), melyek közül a IV, VII, VIII és IX semmiféle antibakteriális hatást nem mutatott a vizsgált baktériumtörzsekkel szemben. Azokat a pool-okat, amelyek antibakteriális hatást mutattak, további lépésekben - Nucleosil 120-10 C18 ill. Nucleosil 100-5 C18 oszlopokon - tovább tisztítottam (2. ábra). A tisztítási lépéseket mindaddig folytattam, amíg egyetlen peptidből álló tiszta frakciót nem kaptam. A tisztítási folyamat minden lépése során az antibakteriális hatást a megfelelő baktériumtenyészetekkel szemben teszteltem. A VI-os pool-ból két peptidet sikerült tiszta formában izolálni 4 ill. 5 tisztítási lépéssel: TP-1 és TP-2 (TP = triptikus peptid), a XI-es pool-ból pedig egy peptidet, 3 tisztítási lépésben (TP-3). Ezután az antibakteriális hatásért felelős peptideket megszekvenáltattam, és az aminosav szekvencia ismeretében azonosítottam azokat a tejfehérjéket, amelyekből a peptidek származnak (2. táblázat).

Az adott peptidek antibakteriális hatásának igazolására a meghatározott aminosav szekvencia alapján a peptideket megszintetizáltattam, a szintetikus peptideket fordított fázisú FPLC-vel tisztítottam, majd 3 mM koncentrációban teszteltem különböző Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumtörzsekkel szemben (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus lentus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus*

zooepidemicus). A szintetikus peptidek csak a Gram-pozitív *B. subtilis* és *Staph. lentus* baktériumokkal szemben mutattak aktivitást, de nem gátolták a Gram-negatív baktériumokat és a Gram-pozitív *Str. Zooepidemicus* sem. Az antibakteriális hatás koncentráció függését *B. subtilis* és *Staph. lentus* baktériumok esetében a 3. ábra szemlélteti.

Nyúl kazein emésztése klosztripainnal

A nyúl kazein frakció klosztripainnal történt emésztése után a RP-FPLC tisztítás nem eredményezett szignifikáns antibakteriális hatással rendelkező pool-okat (3. táblázat) így ezeket nem tisztítottam tovább.

Nyúl kazein emésztése kimotripszinnel

A tripszin, kimotripszin és pepszin emésztések esetében mindig két emésztést végeztem. Először kisebb anyagmennyiségből indultam ki (50 mg), ami alkalmas volt az esetleges antibakteriális peptid fragmentek jelenlétének igazolására, míg a második emésztésnél nagyobb mennyiséget használtam (1 g), hogy legyen elegendő anyag a többlépcsős tisztítás és a bakteriális tesztek elvégzéséhez is. A kimotripszin emésztésnél nem sikerült az első emésztést és elválasztást teljesen reprodukálni. Mind a kromatográfiás pool-ok számában, mind azok antibakteriális hatásában különbségek tapasztalhatóak (4. és 5. táblázat).

A kimotripszin emésztésnél a tripszin emésztéssel megegyező módon jártam el. A kimotripszinnel emésztett nyúl kazein az első tisztítási lépésben 14 pool-t eredményezett (4. ábra), melyek közül egyiknek sem volt jelentős gátló hatása az *Esch. Coli* baktériumokra. A *B. subtilis* törzset az I, VIII, IX és XII-es pool gátolta, míg a *Staph. lentus* ellen az I, VIII és IX-es pool volt gátló hatással (5. táblázat). Ennek megfelelően a VIII, IX és XII-es pool-okat egy második (Nucleosil 120-10 C18 oszlopon) ill. harmadik (Nucleosil 100-5 C18 oszlopon) lépésben tovább tisztítottam (5. ábra). A harmadik tisztítási lépésben kapott pool-ok közül csupán az 1-es és 4-es mutatott gyenge antibakteriális aktivitást *B. subtilis* ellen. Mivel azonban ezek a RP-FPLC pool-ok szekvenáláshoz még nem elegendően tiszták, és az

antibakteriális hatás pedig már gyakorlatilag nem észlelhető, úgy ítélttem meg, hogy a további tisztítási lépéseknek nincs értelme.

Nyúl kazein emésztése pepszinnel

A pepszin emésztés esetében szintén eltérést tapasztaltam az 50 mg és az 1 g kazein emésztés és elválasztás eredménye között. Mind a kromatográfiás pool-ok számában, mind azok antibakteriális hatásában különbségek tapasztalhatóak (6. és 7. táblázat). A nagyobb anyagmennyiség emésztése esetében az azt követő kromatográfiás elválasztás kevésbé volt hatékony, 11 helyett csak 10 pool-t sikerült elkülöníteni (6. ábra) és az antibakteriális hatás mértékében is voltak szignifikáns különbségek. A helyzetet tovább nehezítette, hogy a második emésztés esetében is a pool-ok antibakteriális hatását ugyan mindhárom baktériumtörzzsel szemben teszteltem, de a *B. subtilis* tesztek eredményei ellentmondásosak voltak, és (a baktériumok nem megfelelő növekedése miatt) nem voltak reprodukálhatóak. A további tisztítási lépések esetében ezért csak az *Esch. coli* és *Staph. lentus* tesztek eredményeit vettem figyelembe (7. ábra). A kapott tíz pool közül egy közepesen (V), kettő erősen (II és VI), a többi pedig letálisan (I, III, IV, VII, VIII, IX és X) gátolta a *Staph. lentus* növekedését. *Esch. colival* szemben – ugyan nem ennyire erős – de szintég gátló hatás figyelhető meg nyolc pool esetében: pool I – letális, pool III, IV és VI gyengén, pool VII, VIII, IX és X pedig közepesen gátol. A legerősebb gátlást mutató pool-okat (III, IV, VII, VIII, IX és X) tovább tisztítottam. A második tisztítási lépésben a VII-es, VIII-as, IX-es és X-es pool-okból származó frakciók esetében mértem erős gátló hatást a vizsgált baktériumtörzsekkel szemben.

Műszerezettségi problémák miatt a pályázatban tervezett munkát nem sikerült teljesen befejeznem. A 7. ábrán pirossal jelöltem azon pool-okat, melyeknek további tisztítása folyamatban van.

TÁBLÁZATOK

1. táblázat: Trypszin emésztés. Az első tisztítási lépésben kapott pool-ok antibakteriális hatásának vizsgálata

Trypsin	<i>Esch. Coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. lentus</i>
Pool I	0	0,81 ± 0,37	0,17 ± 0,02
Pool II	0	1,77 ± 0,26	0,08 ± 0,02
Pool III	0	0,40 ± 0,03	0
Pool IV	0	0,03 ± 0,03	0
Pool V	0	1,12 ± 0,12	0,37 ± 0,07
Pool VI	0	0	0,49 ± 0,13
Pool VII	0	0	0
Pool VIII	0	0	0,04 ± 0,02
Pool IX	0	0	0,04 ± 0,02
Pool X	0	1,42 ± 0,09	0,95 ± 0,10
Pool XI	0,50 ± 0,30	> 3,0 ± 0,00	0,10 ± 0,02

Minden érték három párhuzamos mérés átlaga ± SD, letális hatás jelölése: >3,0

2. táblázat: Az izolált kazein peptidek szekvenciája, származása és izoelektromos pontja

<i>Peptid</i>	<i>Szekvencia</i>	<i>Fehérje</i>	<i>Pozíció</i>	<i>pI</i>
TP-1	HVEQLLR	β-kazein	50-56. aminosav	6,5
TP-2	FHLGHLK	α _{S1} -kazein	19-25. aminosav	8,7
TP-3	ILPFIQSLFPFAER	β-kazein	64-77. aminosav	6,0

3. táblázat: Klosztripain emésztés. Az első tisztítási lépésben kapott pool-ok antibakteriális hatásának vizsgálata

Trypsin	<i>Esch. Coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. lentus</i>
Pool I	0	0	0
Pool II	0	0	0
Pool III	0	0	0
Pool IV	0	0,02 ± 0,08	0
Pool V	0	0	0
Pool VI	0	0	0
Pool VII	0	0	0
Pool VIII	0	0	0,04 ± 0,07
Pool IX	0	0	0,12 ± 0,05
Pool X	0	0	0
Pool XI	0	0	0
Pool XII	0	0,06 ± 0,10	0,56 ± 0,19

Minden érték három párhuzamos mérés átlaga ± SD, letális hatás jelölése: >3,0

4. táblázat: Kimotripszin emésztés (50 mg kazein). A RP-FPLC elválasztott pool-ok antibakteriális hatásának vizsgálata

Trypsin	<i>Esch. Coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. lentus</i>
Pool I	0	> 3,0	0,09 ± 0,03
Pool II	0	2,02 ± 0,21	0,04 ± 0,01
Pool III	0	2,02 ± 0,21	0,07 ± 0,02
Pool IV	0	> 3,0	0,04 ± 0,02
Pool V	0	1,43 ± 1,04	0,04 ± 0,02
Pool VI	0,06 ± 0,03	1,56 ± 0,92	0,13 ± 0,01
Pool VII	0,30 ± 0,02	0,95 ± 0,60	0
Pool VIII	0	2,06 ± 0,21	0
Pool IX	0	0,50 ± 0,02	0
Pool X	0	1,29 ± 0,11	0,08 ± 0,02
Pool XI	0	2,21 ± 0,06	0,08 ± 0,02

Minden érték három párhuzamos mérés átlaga ± SD, letális hatás jelölése: >3,0

5. táblázat: Kimotripszin emésztés (1 g kazein). A RP-FPLC elválasztott pool-ok antibakteriális hatásának vizsgálata

Trypsin	<i>Esch. Coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. lentus</i>
Pool I	0,09	> 3	> 3,0
Pool II	0,04	0,51	0,32
Pool III	0	0	0,11
Pool IV	0	0,12	0,23
Pool V	0	0,01	0,21
Pool VI	0	0,01	0,49
Pool VII	0	0	0,54
Pool VIII	0,09	> 3,0	2,25
Pool IX	0	1,89	2,55
Pool X	0	0,83	0,66
Pool XI	0,08	0,05	0,27
Pool XII	0,06	1,67	0,22
Pool XIII	0	0,27	0,04
Pool XIV	0	0,07	0,03

6. táblázat: Pepszin emésztés (50 mg kazein). A RP-FPLC elválasztott pool-ok antibakteriális hatásának vizsgálata

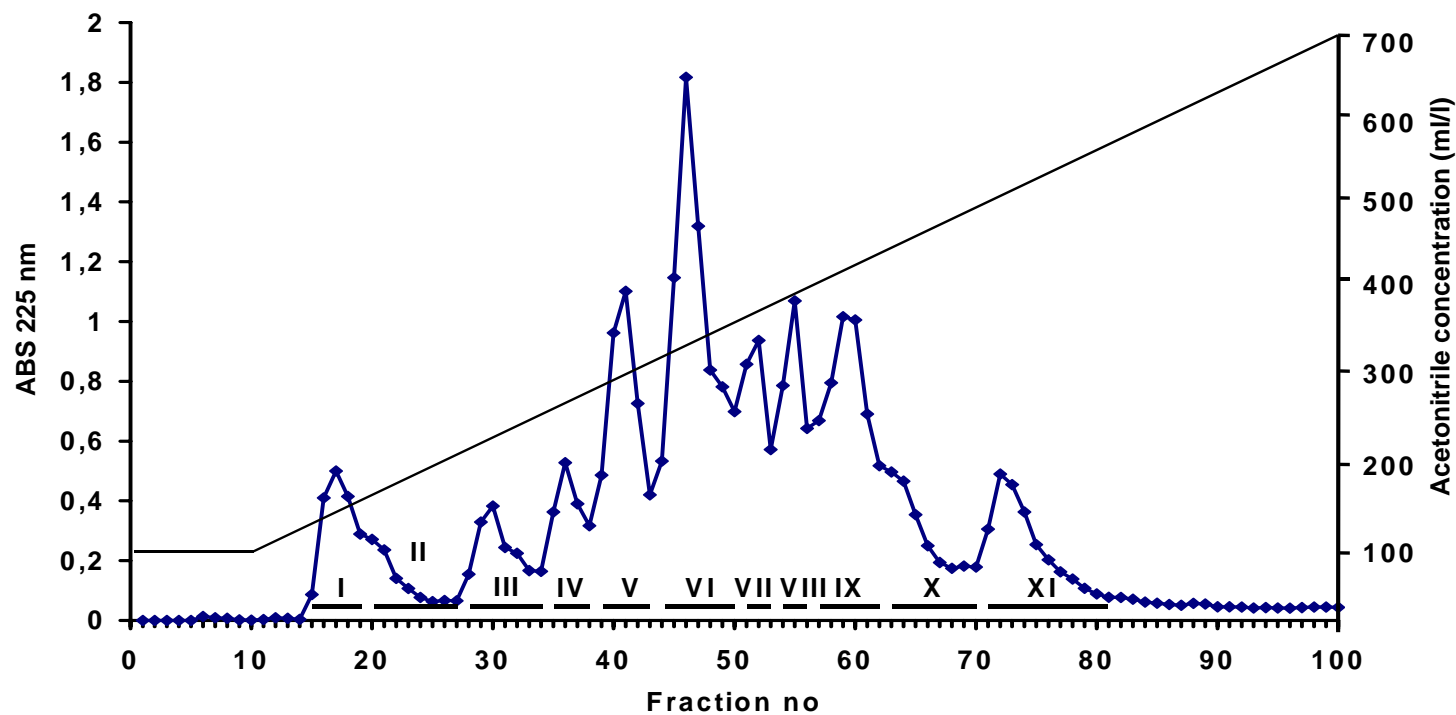
Trypsin	<i>Esch. Coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Staph. lentus</i>
Pool I	$> 3,0 \pm 0,00$	$> 3,0 \pm 0,00$	$> 3,0 \pm 0,00$
Pool II	$0,17 \pm 0,09$	$> 3,0 \pm 0,00$	$> 3,0 \pm 0,00$
Pool III	0	$1,57 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,01$
Pool IV	0	$1,09 \pm 0,32$	$0,36 \pm 0,02$
Pool V	0	0	$0,20 \pm 0,02$
Pool VI	0	0	$0,51 \pm 0,04$
Pool VII	0	$0,38 \pm 0,04$	$> 3,0 \pm 0,00$
Pool VIII	$2,02 \pm 0,34$	$> 3,0 \pm 0,00$	$> 3,0 \pm 0,00$
Pool IX	0	0	$0,16 \pm 0,01$
Pool X	0	0	0
Pool XI	0	0	$0,05 \pm 0,03$

Minden érték három párhuzamos mérés átlaga \pm SD, letális hatás jelölése: $>3,0$

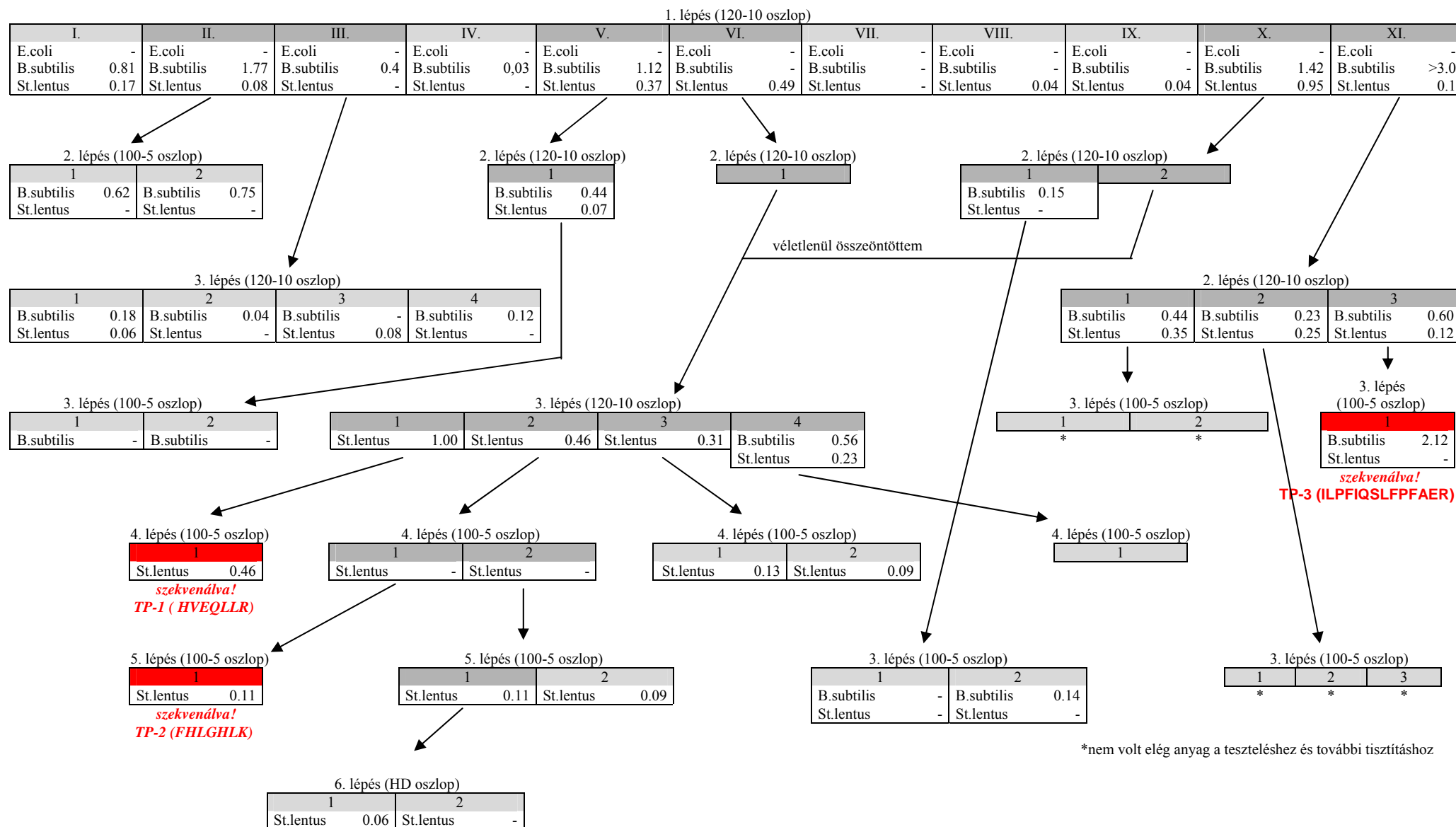
7. táblázat: Pepszin emésztés (1 g kazein). Az első tisztítási lépésben kapott pool-ok antibakteriális hatásának vizsgálata

Trypsin	<i>Esch. Coli</i>	<i>Staph. lentus</i>
Pool I	$> 3,0$	$> 3,0$
Pool II	0	2,06
Pool III	0,47	$> 3,0$
Pool IV	0,6	$> 3,0$
Pool V	0	0,92
Pool VI	0,29	2,04
Pool VII	0,92	$> 3,0$
Pool VIII	0,89	$> 3,0$
Pool IX	1,04	$> 3,0$
Pool X	2,23	$> 3,0$

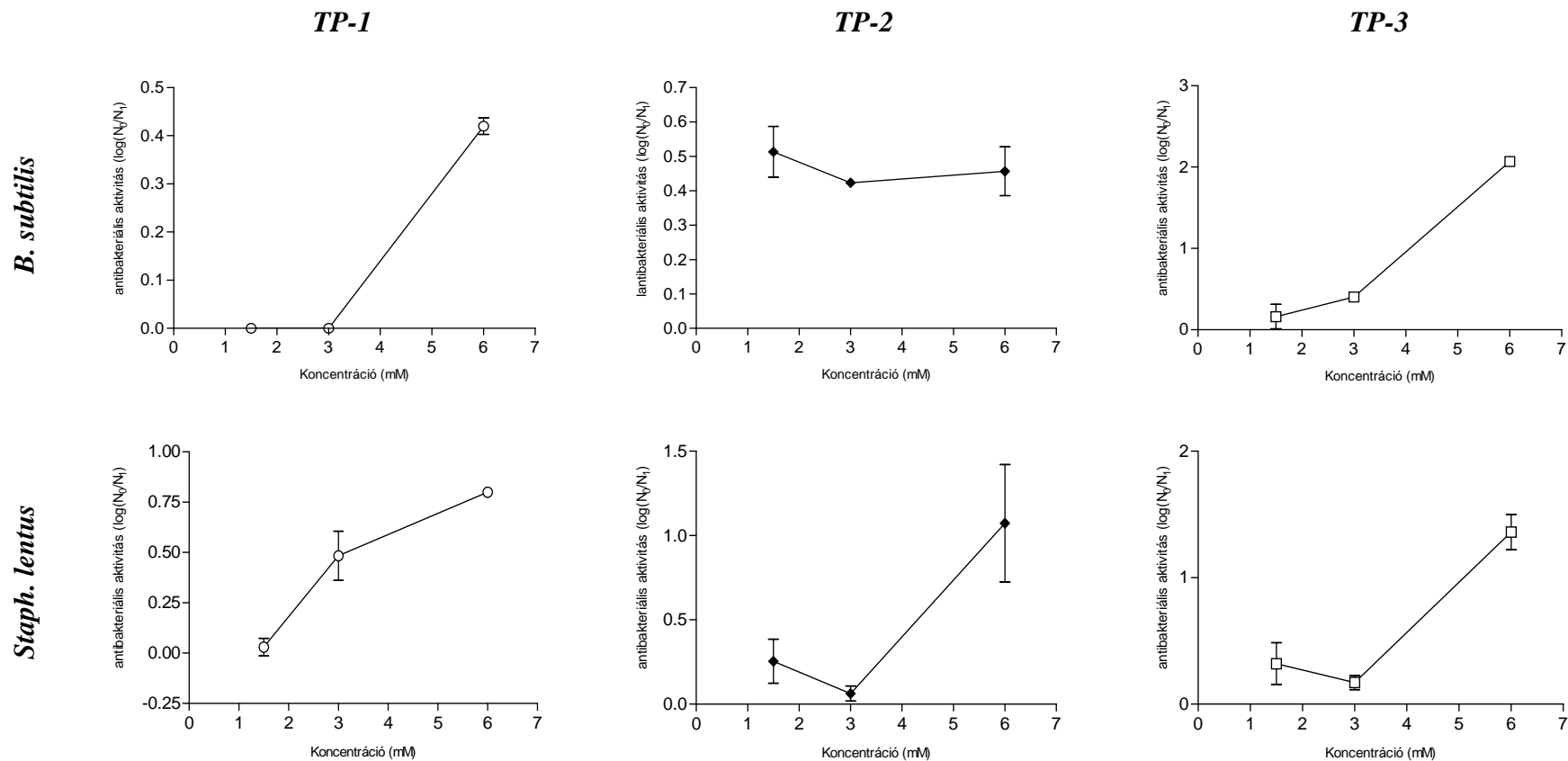
ÁBRÁK



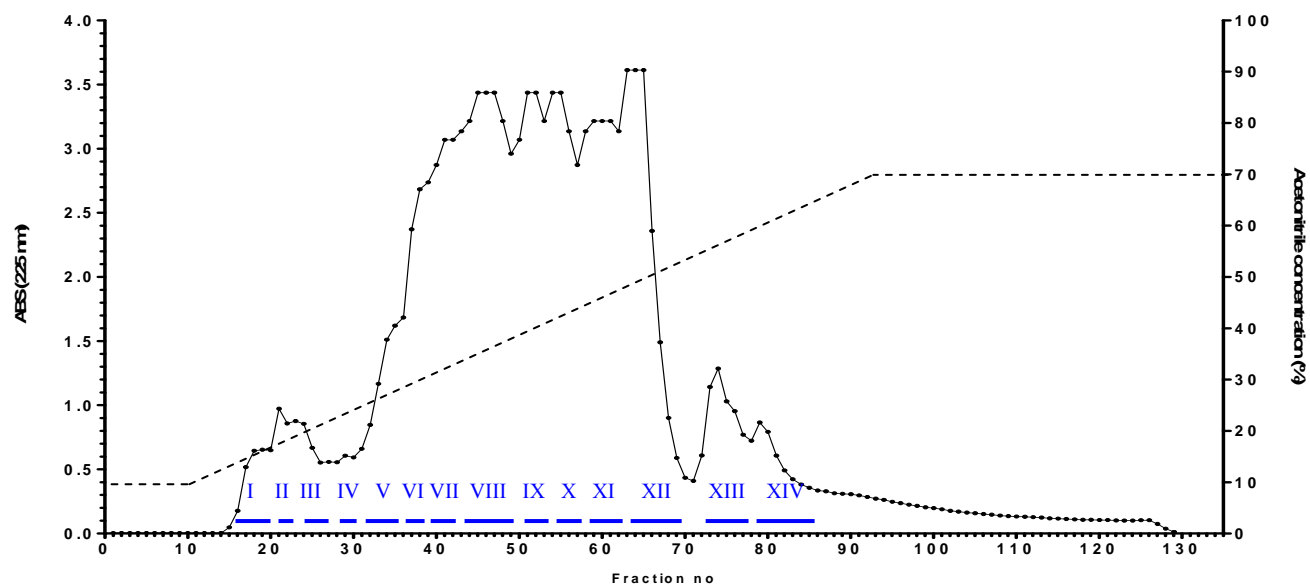
1. ábra: A tripszin emésztés első tisztítási lépésének kromatogramja a pool-ok feltüntetésével



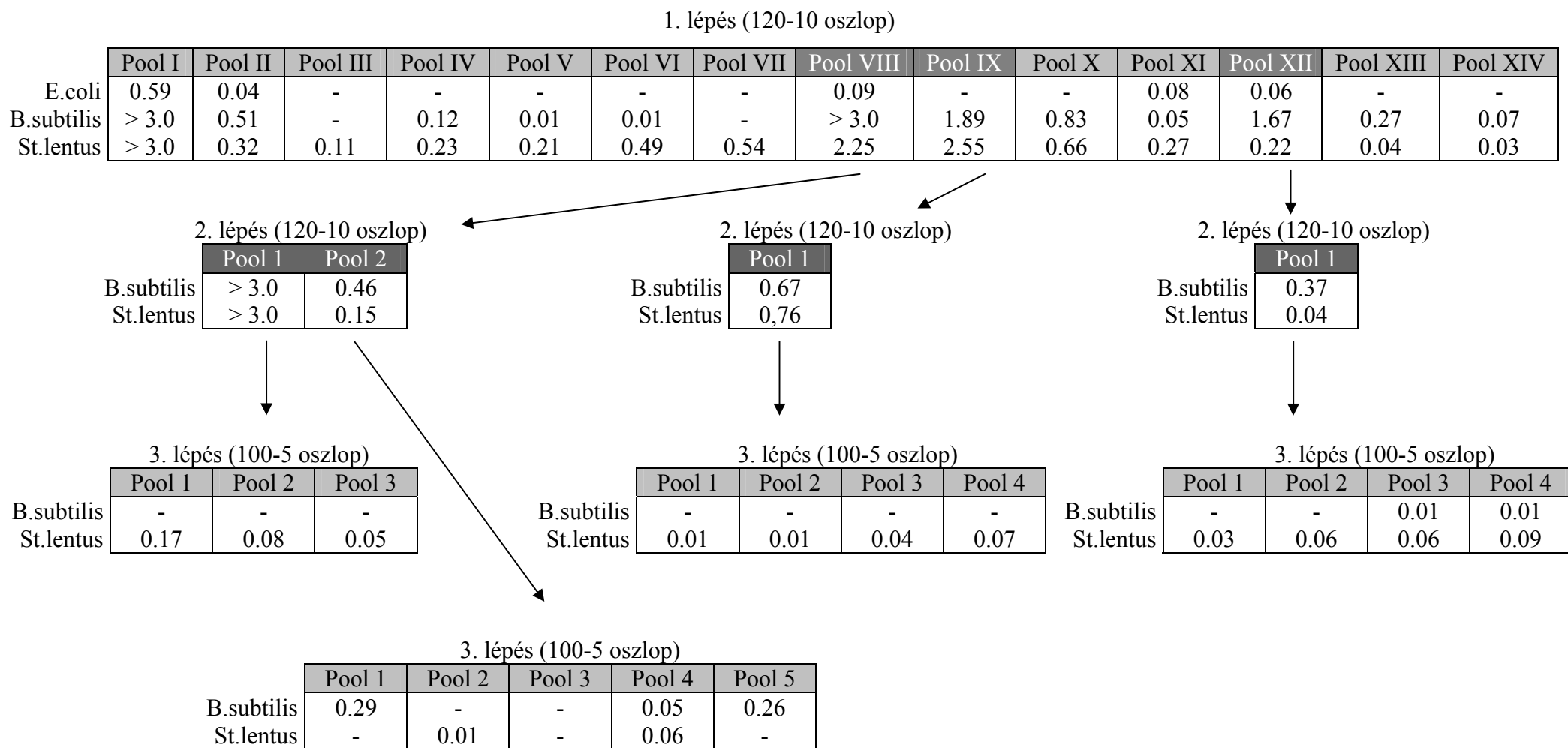
2. ábra: Triptikus peptid fragmentek tisztításának folyamatábrája az egyes pool-ok antibakteriális hatásának feltüntetésével



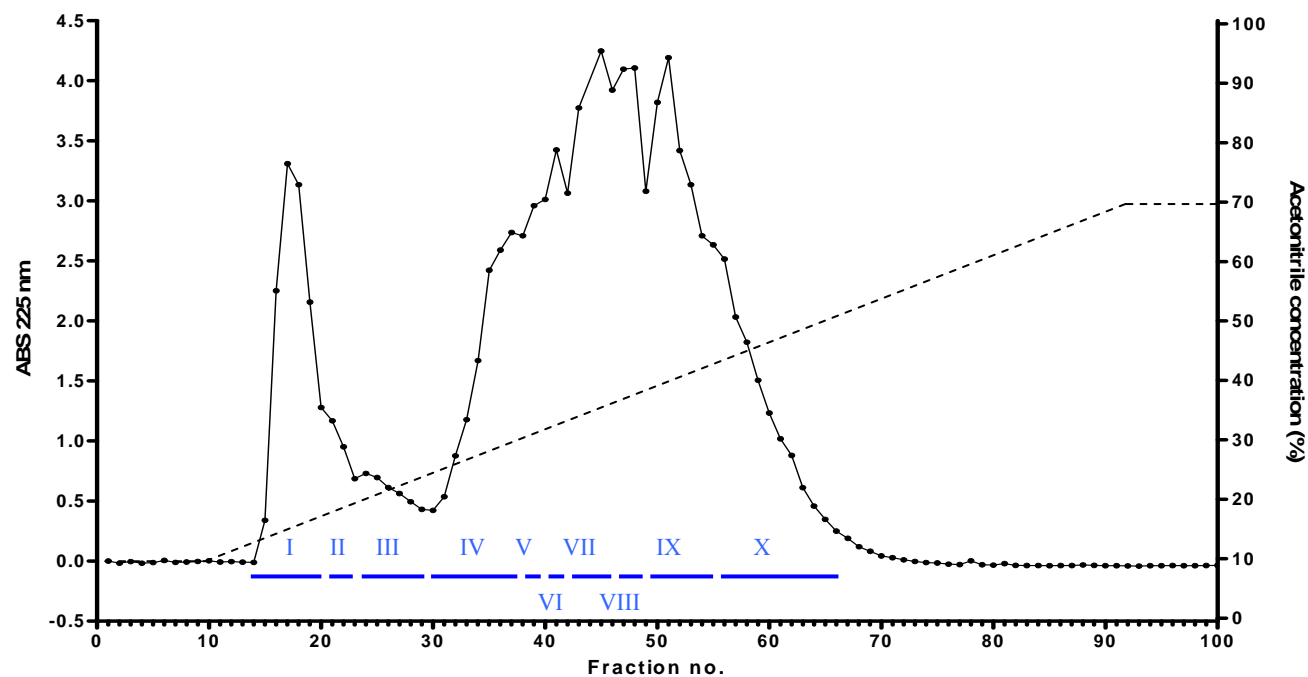
3. ábra: A szintetikus peptidok antibakteriális hatásának koncentrációfüggése *B. subtilis* és *Staph. lentus* baktériumtörzsek esetében.



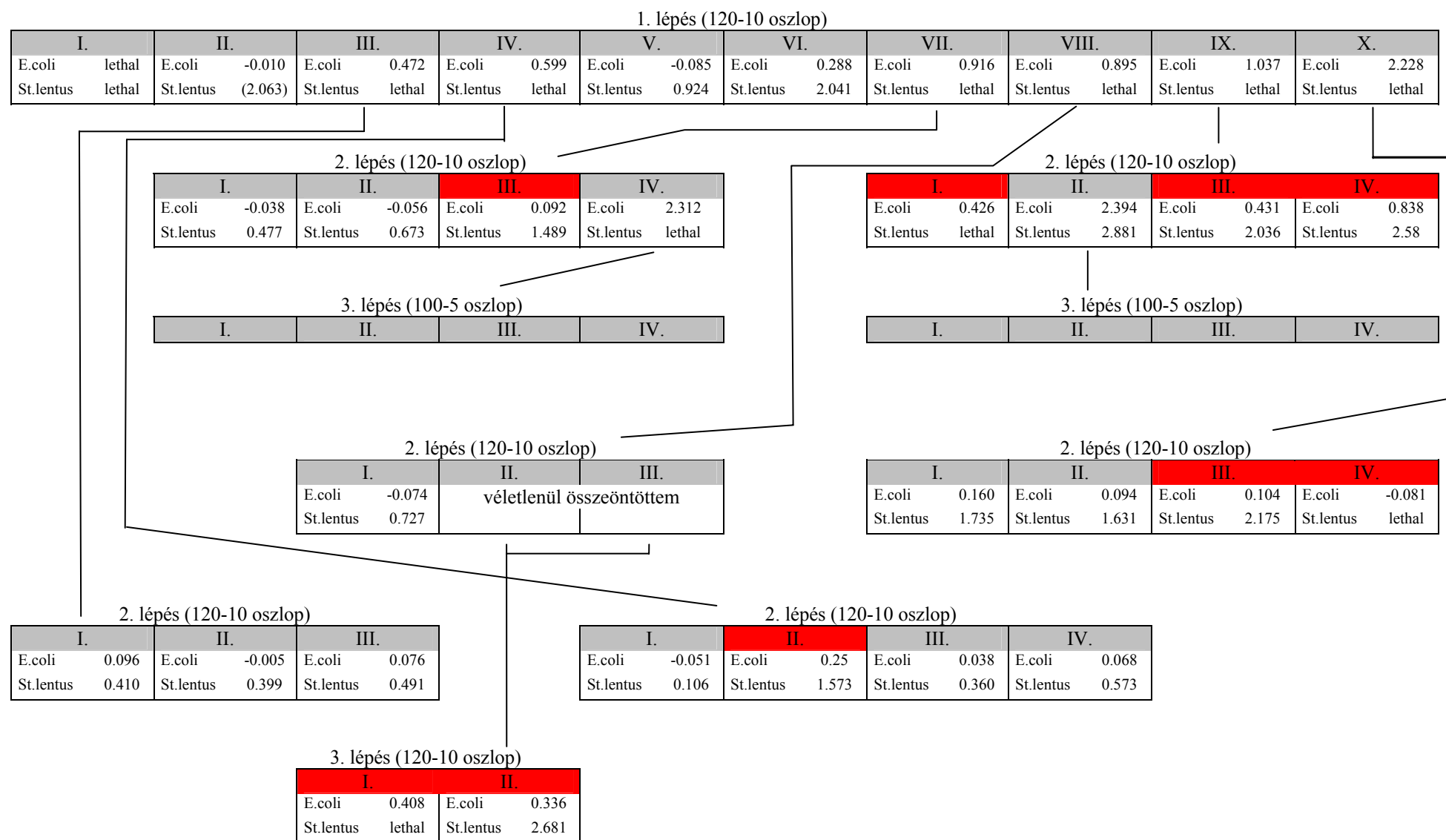
4. ábra: A kimotripszin emésztés első tisztítási lépésének kromatogramja a pool-ok feltüntetésével



5. ábra: Kimotripszin emésztett peptid fragmentek tisztításának folyamatábrája az egyes pool-ok antibakteriális hatásának feltüntetésével



6. ábra: A pepszin emésztés első tisztítási lépésének kromatogramja a pool-ok feltüntetésével



7. ábra: Pepszin emésztett peptid fragmentek tisztításának folyamatábrája az egyes pool-ok antibakteriális hatásának feltüntetésével